

Rec'd PCT/PTO 03 MAR 2005

10/526468

(12) NACH DEM VERTEIL ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022772 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12Q 1/00

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009757

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2003 (02.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 41 111.5 3. September 2002 (03.09.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): ERNST-MORITZ-ARNDT-UNI VERSITÄT
GREIFSWALD [DE/DE]; Domstr. 14, 17487 Greifswald
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): WALTHER, Reinhard
[DE/DE]; Grüner Weg 9A, 17498 Neuenkirchen (DE).

(74) Anwälte: WEBER-QUITZAU, Martin usw.; Uexküll &
Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE,
DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL,
PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: MODULATION OF THE SYNTHESIS OF INSULIN

(54) Bezeichnung: MODULATION DER INSULINSYNTHESE

(57) Abstract: The invention particularly relates to the use of substances, which modulate the activity of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon and/or of the PcG protein EED or which influence the binding of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon, of the PcG protein EED and/or of a fragment thereof with the protein pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) that plays a decisive roll in the glucose-induced biosynthesis of insulin, for influencing the synthesis of insulin or the provision of insulin.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Substanzen, die die Aktivität der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon und/oder des PcG-Proteins EED modulieren oder die Bindung der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon, des PcG-Proteins EED und/oder eines Fragments desselben mit dem Protein Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), das bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflussen, zur Beeinflussung der Insulin-Synthese bzw. Bereitstellung.

BEST AVAILABLE COPY

WO 2004/022772 A2

17/PRTS

10/526468
DT01 Rec'd PCT/PTC 03 MAR 2005

Modulation der Insulinsynthese

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Substanzen, die die Aktivität der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon und/oder des PcG-Proteins EED modulieren oder die Bindung der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon, des PcG-Proteins EED und/oder eines Fragments derselben mit dem Protein Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), das bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflussen, zur Beeinflussung der Insulin-Synthese bzw. – Bereitstellung.

Im Säugerorganismus wird nach einer Mahlzeit, ausgelöst durch die Glucosebelastung, von den Beta-Zellen der Langerhans'schen Inseln des endokrinen Pankreas in Sekretgranula gespeichertes Insulin sezerniert. Gleichzeitig kommt es zu einer Neusynthese von Insulin (Transcription, Translation). Es wurde festgestellt, daß PDX-1 als Transkriptionsfaktor beteiligt ist (McKinnon and Docherty, Diabetologia (2001), 44: 1203-1214) und die Transkriptions-auslösenden Signalwege durch Wortmannin und SB 203580 hemmbar sind. Derzeit ist aber unbekannt, wie die Vorgänge, die zur Sekretion von Insulin führen, und die Induktion der Neusynthese gekoppelt sind.

Aufgabe ist es daher, Substanzen (Wirkstoffe) zur Verfügung zu stellen, die die Insulin-Bereitstellung wirksam beeinflussen und damit zur Behandlung von Erkrankungen geeignet sind, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, wie z.B. Diabetes.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurden überraschend drei Proteine identifiziert, die an den Transkriptionsfaktor PDX-1 binden, der bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt (vgl. u.a. Lottmann et al., Journal of Molecular Medicine (2001) 79:321-328). Direkte, unmittelbare Aktivatoren von PDX-1 sind im Stand der Technik bislang nicht bekannt.

Erfindungsgemäß wurden in einem eigens entwickelten experimentellen Zellsystem nach Induktion mit Glucose Proteine identifiziert, die in dieser Phase i) selbst phosphoryliert werden und ii) mit dem Transkriptionsfaktor PDX-1 physikalisch interagieren. PDX-1 selbst wird ebenfalls Glucose-induziert phosphoryliert, wobei wichtig ist, dass bakteriell exprimiertes PDX-1 erst nach Phosphorylierung an die DNA binden und als Aktivator agieren kann.

In diesem Zusammenhang stellt CK II in der Insulin-produzierenden Zelle eine Glucose-induzierte PDX-1-Kinase dar. Bei der Caseinkinase II handelt es sich um eine weit verbreitete Serin/Threonin-Kinase. Das Holoenzym besteht aus einem Tetramer aus zwei alpha- oder alpha'-Untereinheiten (oder jeweils eine dieser Untereinheiten) und zwei beta-Untereinheiten (Lotzeman et al., Biochemistry 36 (1990) 8436-47). Damit kann erfindungsgemäß über die Veränderung der Aktivität dieses Enzyms die Insulin-Bereitstellung moduliert werden.

Die 14-3-3 Proteine werden als Regulator-Proteine beschrieben, die in der Zelle Schlüsselemente von Signaltransduktionswegen binden (wie z.B. den Transkriptionsfaktor FKHR) und damit inaktivieren können. Erst durch Phosphorylierung der 14-3-3 Proteine wird diese Bindung aufgehoben. Das Protein 14-3-3 epsilon hält im unphosphorylierten Zustand den Transkriptionsfaktor PDX-1 gebunden und inaktiv. Nach Glucose-Induktion wird 14-3-3 epsilon phosphoryliert und kann den gebundenen, inaktiven Transkriptionsfaktor PDX-1 freisetzen, der dann als aktivierender Faktor die Insulinsynthese initiiert.

Das EED-Protein gehört zu den Transkriptions-Repressoren, wobei an dem Vorgang der Repression Histon-Deacetylasen beteiligt zu sein scheinen. Erfindungsgemäß handelt es

sich bei der EED um eine große Isoform des Proteins, auf die in Sewalt et al., Mol. Cell. Biol. 18 (1998) 3586-95 (vgl. Fig. 4) verwiesen wird.

Mit den vorliegenden Arbeiten ist es somit gelungen, die drei genannten Proteine (CK II, 14-3-3 epsilon und EED) als wesentliche regulative Elemente der Glucose-induzierten Insulinbiosynthese zu identifizieren. Der oben dargestellte Zusammenhang mit dem Transkriptionsfaktor PDX-1, mit dem die Proteine physikalisch interagieren, ermöglicht nunmehr die Identifizierung neuer Wirkstoffe, die effizient die Insulin-Bereitstellung beeinflussen können und zur Entwicklung einer neuen, effektiveren Generation von Diabetes-Therapeutika mit weniger Nebenwirkungen führen. Das Screening kann mit geeigneten Assays durchgeführt werden, wie z.B. Bindungsassays, mit deren Hilfe sich die Beeinflussung der Wechselwirkung (Bindung) der genannten Proteine mit PDX-1 direkt untersuchen läßt, oder einem Assay, bei dem man die Funktionalisierung von PDX-1 (Phosphorylierung, DNA-Bindung, Transkriptionsaktivierung) unter Stoffeinfluss analysiert. Die Etablierung solcher Assays ist dem Fachmann wohl bekannt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher die Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und 12 (EED) oder Fragmenten derselben zur Durchführung von Bindungsassays unter Verwendung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), wobei die Fragmente an PDX-1 binden, zur Identifikation von Substanzen, die die Bindung zwischen dem oder den Proteinen oder Fragment(en) und PDX-1 beeinflussen (fördern, hemmen, modulieren).

Die Erfindung betrifft unter anderem ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment desselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man

- a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben markiert,
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) markiert,

- c) die markierten Proteine von Stufe a) und Stufe b) miteinander in Kontakt bringt und eine Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die Markierungen so gewählt sind, daß eine Wechselwirkung der markierten Proteine von Stufe a) und b) nachweisbar und von den isolierten, markierten Proteinen durch Änderung des/der Detektionssignals/Detektionssignale unterscheidbar ist, man

- d) die Mischung von Stufe c) mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und man
- e) eine weitere Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn sich das(die) in Stufe e) gemessene(n) Markersignal(e) von dem (den) in Stufe c) gemessenen Markersignal(en) unterscheidet.

Ferner eingeschlossen ist ein Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man entweder

- a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED, ein Fragment derselben oder
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert,
- c) das jeweils andere Protein markiert und es mit dem immobilisierten Protein in Kontakt bringt, wobei man das Vorliegen einer Wechselwirkung zwischen den in a) und b) genannten Proteinen nach Durchführung entsprechender Waschschritte durch Nachweis der Markierung bestätigt, man
- d) die Proteine mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn die Markierung nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz und Durchführung entsprechender Waschschriffe auf den Mikrotiterplatten nicht mehr nachweisbar ist.

Die mit Hilfe der durchgeföhrten Screening-Verfahren identifizierten Wirkstoffe können zur Behandlung (patho)physiologischer Zustände, bei denen eine gegenüber dem Normalwert verminderte Insulinproduktion beobachtet wird, eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft daher die Verwendung einer Substanz, die die Wechselwirkung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und EED oder Fragmenten derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflusst, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

Ferner eingeschlossen ist die Verwendung einer Substanz, die

- b) die Aktivität des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und/oder des Proteins EED moduliert,
- b) an das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben bindet,
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), 4 und/oder 6 und 8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) oder das Protein EED phosphoryliert, oder
- b) den Anteil des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II) erhöht,

zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

Vorliegend wird unter einer Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit einer verminderten Insulin-Synthese einhergeht, verschiedene Formen von Diabetes, wie z.B. Diabetes mellitus verstanden.

Die Erfindung betrifft ferner ein Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, bei dem man ein vorgenanntes Screening-Verfahren durchführt und man die identifizierte Substanz, die als eine die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflussende Substanz identifiziert ist, mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert.

Erfindungsgegenstand sind somit auch pharmazeutische Zusammensetzungen, die eine nach einem vorgenannten Screening-Verfahren erhältliche Substanz und pharmazeutisch verträgliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthalten.

Gemäß einer besonderen Ausführungsform können auch eines oder mehrere Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und EED und/oder Fragmente derselben zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung einer Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit dieser einhergeht, verwendet werden.

Die Erfindung betrifft ferner die Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 3 und/oder 5 und 7 oder 9 und/oder einer oder mehrerer für EED kodierender Nukleinsäuren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Modulation der Insulin-Synthese in einem Individuum. Diese Präparate können beispielsweise in der Gentherapie, z.B. bei der Generierung artifizierter, insulinproduzierender Zellen für eine Transplantation, Anwendung finden.

Im Rahmen der durchgeführten Arbeiten wurde erstmals das Protein (EED), bei dem es sich um eine EED-Isoform handelt (vgl. Fig. 4 in Sewalt et al. Mol Cell Biol (1998), 18(6): 3586-95), als regulatives Element identifiziert, das ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Insulinbiosynthese spielt. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind Fragmente der vorgenannten Proteine, wobei der Begriff EED auch die kürzere Isoformen von EED einschließt (vgl. Fig. 15).

Anhand der gewonnenen Erkenntnisse lassen sich Assays zur Messung der Funktionalisierung von PDX-1 konstruieren, die Aufschluss über die Eigenschaft von Substanzen geben, die Bindung von PDX-1 an den Promotor des Insulin-Gens zu inhibieren bzw. zu fördern. So lassen sich anhand von molekularbiologischen Standardverfahren beispielsweise transgene Zellkulturen etablieren, in die man ein Reportergen einbringt, dessen Genprodukt leicht detektierbar und quantifizierbar ist, und das unter der Kontrolle eines Promotors mit PDX-1-bindenden DNA-Sequenzen stabil exprimiert wird. Unter Induktionsbedingungen, d.h. bei Bindung von PDX-1 an den Promotor, kann dann die Expression des Reportergens unter Einfluss der zu testenden Substanz analysiert werden.

Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert.

Beispiele

Material und Methoden

Identifizierung von Glucose-induzierten phosphorylierten Interaktionspartnern von PDX-1:

MIN 6-Zellen wurden bis zur 80%-igen Konfluenz in DMEM kultiviert, das 25 mM Glucose, 10% Pferde-Serum und 2,5% FCS (fötales Kälber-Serum) enthielt. Die Zellen wurden zwei Mal gewaschen, und man ließ die Zellen im Krebs-Ringer-Puffer (118 mM Natriumchlorid, 4,75 mM Kaliumchlorid, 1,25 mM Kalziumchlorid, 1,2 mM Magnesiumchlorid, 0,05% (w/v) BSA, 25 mM Natriumhydrogencarbonat, 10 mM Hepes, pH 7,4) für drei Stunden hungern. Nach der dreistündigen Vorinkubation der Zellen wurden diese mit 500 µCi/ml (³²P)-Phosphorsäure (ICN) für eine Stunde equilibriert und anschließend in Gegenwart oder Abwesenheit von 16 mM Glucose mit und ohne die Kinaseinhibitoren Wortmannin (100 nM, 10 min Vorinkubation) und SB203580 [(4-(4-Fluorphenyl)-2-(4-methylsulfinylphenyl)-5-(4-pyridyl)-imidazol] (10 mM, 30 min Vorinkubation) für weitere 30 min inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und geerntet. Die Zellen wurden für 30 Sekunden zentrifugiert und in 100 µl 20 mM Hepes 7,8, 50 mM Kaliumchlorid, 1% Triton X-100, 0,1 mM EDTA, 20 mM β-Glycerophosphat, 0,1 mM Na₃PO₄, vollständiger Miniprotease Inhibitorcocktail (Roche), resuspendiert. Die Zellen

ließ man für 10 Minuten auf Eis anschwellen und zentrifugierte anschließend bei 14.000 U/min. Der Überstand (cytoplasmatischer Extrakt) wurde in ein frisches Eppendorf-Gefäß überführt, und die Proteine wurden unter der Verwendung von Aceton präzipitiert, mehrfach in Aceton gewaschen, getrocknet und in Lysis-Puffer (8 M Harnstoff, 2 M Thioharnstoff, 65 mM Chaps, 120 mM DTT, 80 mM Tris) solubilisiert. Für die präparativen Gele wurden die markierten Extrakte mit 4 mg nicht-radioaktiven cytoplasmatischen Extrakten gemischt, die ähnlich behandelt wurden. Die Proteintrennung erfolgte unter Verwendung eines immobilisierten pH-Gradienten von 3 bis 10 (IPG-Streifen, 18 cm, Amersham Biosciences) in einen IPGphor-isoelektrischem-Focussier-System (Amersham Biosciences). Nach Equilibrieren des Streifens in SDS-Puffer wurde die zweite Dimension der SDS-PAGE über Nacht unter Verwendung eines 12,5%igen Acrylamidgels durchgeführt. Die präparativen Gele wurden mit kolloidalem Coomassi R-250 gefärbt und einer Autoradiographie unter Verwendung eines Phosphor-Imagers (Molecular dynamics) unterworfen. Die analytischen Gele wurden einer Autoradiographie unterworfen. Es wurden sogenannte „Pulldown-Experimente“ unter Verwendung eines bakteriellen exprimierten GST-PDX-1 Proteins als Köder im Cytoplasma von Glucose stimulierten, ³²P-markierten MIN6 Zellen durchgeführt. Nach Zugabe von 5 µg GST zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde GST-PDX-1-Fusionsprotein, das an Gluthation-Agarose-Beads gekoppelt war, mit 100 mg cytoplasmatischem Extrakt bei drei Stunden und 4°C und unter durchgehendem Schütteln inkubiert. Nach dieser Inkubationsphase wurden die Beads bei 3000 g für 5 Minuten pelletiert, und der Überstand wurde gesammelt und für die zweidimensionale Gelelektrophorese verwendet. Um die Interaktion von Phosphoproteinen mit dem GST-PDX-1 Protein nachzuweisen, wurden die pelletierten Beads 3 Mal gewaschen, in Lysis-Puffer suspendiert und anschließend der zweidimensionalen Gelelektrophorese unterworfen. Die Immunfluoreszenz-Färbung und das Western-Blotting wurden unter Verwendung von Standard-molekularbiologischen Protokollen verwendet.

Ergebnisse:

Im Autoradiogramm des analytischen Geles des "Pulldown" (Fig 5, A) wurden Spots von phosphorylierten, mit PDX-1-interagierenden Proteinen detektiert. Diese Spots konnten in präparativen Gelen Coomassie-gefärbten Spots zugeordnet werden und wurden mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) identifiziert.

Beschreibung der Figuren

Figur 1:

Schematische Darstellung des Nachweises von Glucose-induzierten Interaktionspartnern von PDX-1

Figur 2:

Auswirkung von Glucose auf die subzelluläre Lokalisation von endogenem PDX-1. A: Die Zellen wurden in Krebs-Ringer-Puffer für vier Stunden mit 0 mM Glucose inkubiert. B: Die Kultur wurde anschließend 30 Minuten bei 16 mM Glucose weiterkultiviert. Endogenes PDX-1 wurde unter Verwendung eines polyclonalen Anti-PDX-1 Antiserums nachgewiesen.

Figur 3:

PDX-1 wird bei hohen Glucosekonzentrationen in MIN6-Zellen modifiziert. Western-Blot-Analyse von nukleären und cytoplasmatischen Extrakten, die aus MIN6-Zellen hergestellt wurden, und in Krebs-Ringer-Puffer bei 0 mM Glucose (Bahn 1) inkubiert und anschließend auf 16 mM Glucose (Bahn 2) transferiert wurden.

Figur 4:

Silberfärbung von bakteriell exprimiertem GST-PDX-1. 5 µg (Bahn 1) und 1 µg (Bahn 2) gereinigtes GST-PDX-1; in E. coli exprimiert und mittels Polyacrylamidgelelektrophorese getrennt.

Figur 5:

Bakteriell exprimiertes GST-PDX-1 präzipitiert Phosphoproteine aus dem Cytoplasma von ³²P-markierten, Glucose-stimulierten MIN6-Zellen.

A: Kartierung von erhaltenen Phosphoproteinen, die durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach einem GST-PDX-1-Pulldown-Experiment erhalten wurden.

B: Cytoplasmatische Phosphoproteine, die durch zweidimensionale Gelelektrophorese nach Acetonpräzipitation getrennt wurden.

Figur 6:

Bakteriell exprimiertes GST-PDX-1 verringert die Menge eines Phosphoproteins im Überstand von ^{32}P -markierten, Glucose-stimulierten MIN6-Zellen vor der zweidimensionalen Gelelektrophorese.

- A: Die vergrößerte Region des 2D-Gels, das einer Autoradiographie wurde, zeigt die erhaltenen Phosphoproteine.
- B: Die vergrößerte Region eines 2D-Gels, das der Autoradiographie unterworfen wurde, zeigt cytoplasmatische Phosphoproteine nach Acetonpräzipitation.
- C: Die vergrößerte Region eines 2D-Gels, das der Autoradiographie unterworfen wurde, zeigt cytoplasmatische Phosphoproteine nach Acetonpräzipitation mit nachfolgender Inkubation mit GST-PDX-1 Fusionsproteinen.

Figur 7:

Veränderungen des Phosphorylierungszustands des ausgewählten cytoplasmatischen Proteins als Reaktion auf Glucose und verschiedene Kinaseinhibitoren.

A-D:

Vergrößerte Regionen von 2D-Gelen, die der Autoradiographie nach erfolgter Acetonpräzipitation unterworfen wurden.

A: MIN6-Zellen wurden für 8 Stunden bei 0 mM Glucose in Krebs-Ringer-Puffer inkubiert.

B: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose transferiert.

C: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose in Gegenwart von Wortmannin (100 nM) transferiert.

D: Die Kultur wurde auf 16 mM Glucose in Gegenwart von SB203580 (10 μM) transferiert.

Figur 8:

Identifizierung von 14-3-3-epsilon als Interaktionspartner von GST-PDX-1.

A: Die Ergebnisse der MS-Fit-Suche ergaben Massen eines Phosphoproteins, welches quantitativ aus dem Cytoplasma von Glucose-behandelten MIN6-Zellen unter Verwendung eines bakteriellen exprimierten GST-PDX-1 Proteins präzipitiert werden konnte.

B: Western-Blot unter Verwendung eines Anti-14-3-Epsilon-Antiserums (Santa Cruz).
Bahn 1 (Positivkontrolle): 30 µg cytoplasmatischer Extrakt von Glucose-behandelten MIN6-Zellen. Bahn 2 (Negativkontrolle): GST-Pulldown von 400 µg Glucose-behandelten MIN6-Zellen. Bahn 3: GST-PDX-1 Pulldown von 400 µg Glucose-behandelten MIN6-Zellen.

Figur 9:

Aminosäuresequenz von PDX-1 (SEQ ID NO:2).

Figur 10:

Für PDX-1 kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:1).

Figur 11:

Aminosäuresequenz von 14-3-3 epsilon (SEQ ID NO:10).

Figur 12:

Für 14-3-3 epsilon kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:9).

Figur 13:

Aminosäuresequenz der CK II-Untereinheiten

- a) Aminosäuresequenz von CKII-alpha' (SEQ ID NO:4)
- b) Aminosäuresequenz von CKII-alpha (SEQ ID NO:6)
- c) Aminosäuresequenz von CKII-beta (SEQ ID NO:8)

Figur 14:

Für die CK II-Untereinheiten kodierende Nukleotidsequenz

- a) für CKII-alpha' kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:3)
- b) für CKII-alpha kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:5)
- c) für CKII-beta kodierende Nukleotidsequenz (SEQ ID NO:7)

Figur 15:

Nukleotidsequenzen der kurzen EED-Isoform (SEQ ID NO:11)

Figur 16:

Aminosäuresequenzen der kurzen EED-Isoform (SEQ ID NO:12)

Patentansprüche

1. Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder Fragmenten derselben zur Durchführung von Bindungsassays unter Verwendung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), wobei die Fragmente an PDX-1 binden, zur Identifikation von Substanzen, die die Bindung zwischen dem oder den Proteinen oder Fragment(en) und PDX-1 beeinflussen (fördern, hemmen, modulieren).
2. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), des Proteins EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man
 - a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben markiert,
 - b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) markiert,
 - c) die markierten Proteine von Stufe a) und Stufe b) miteinander in Kontakt bringt und eine Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,wobei die Markierungen so gewählt sind, daß eine Wechselwirkung der markierten Proteine von Stufe a) und b) nachweisbar und von den isolierten, markierten Proteinen durch Änderung des/der Detektionssignals/Detektionssignale unterscheidbar ist, man
 - d) die Mischung von Stufe c) mit einer zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt und man
 - e) eine weitere Messung zur Bestimmung des/der Markersignals/Markersignale durchführt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn sich das(die) in Stufe e) gemessene(n) Markersignal(e) von dem(den)

in Stufe c) gemessenen Markersignal(en) unterscheidet.

3. Verfahren zur Identifizierung von Substanzen, die geeignet sind, die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) zu beeinflussen, bei dem man entweder

- a) das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED, ein Fragment derselben oder
- b) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) auf einer Mikrotiterplatte immobilisiert,
- c) das jeweils andere Protein markiert und es mit dem immobilisierten Protein in Kontakt bringt, wobei man das Vorliegen einer Wechselwirkung zwischen den in a) und b) genannten Proteinen nach Durchführung entsprechender Waschschritte durch Nachweis der Markierung bestätigt, man
- d) die Proteine mit der zu untersuchenden Substanz in Kontakt bringt,

wobei die zu untersuchende Substanz eine die Wechselwirkung beeinflussende Substanz ist, wenn die Markierung nach Zugabe der zu untersuchenden Substanz und Durchführung entsprechender Waschschritte auf den Mikrotiterplatten nicht mehr nachweisbar ist.

4. Verwendung einer Substanz, die die Wechselwirkung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder Fragmenten derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflusst, zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

5. Verwendung einer Substanz, die

- a) die Aktivität des Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) und/oder des Proteins EED moduliert,

- b) an das Protein gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), das Protein EED oder ein Fragment derselben bindet,
- c) das Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1), SEQ ID:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon) oder das Protein EED phosphoryliert, oder
- d) den Anteil des Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II) erhöht,

zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen.

- 6. Verwendung nach den Ansprüchen 4 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder mit dieser einhergeht, Diabetes ist.
- 7. Verfahren zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung zur Behandlung von Erkrankungen, die durch eine verminderte Insulin-Synthese charakterisiert sind oder mit dieser einhergehen, dadurch gekennzeichnet, daß man ein Verfahren nach den Ansprüchen 2 oder 3 durchführt und man die Substanz, die als eine die Wechselwirkung eines Proteins gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED oder einem Fragment derselben mit dem Protein gemäß SEQ ID NO:2 (PDX-1) beeinflussende Substanz identifiziert ist, mit geeigneten Hilfs- und/oder Trägerstoffen zu einer pharmazeutischen Zusammensetzung formuliert.
- 8. Pharmazeutische Zusammensetzung, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine nach einem Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 oder 3 erhältliche Substanz und pharmazeutisch verträgliche Hilfs- und/oder Trägerstoffe enthält.
- 9. Verwendung eines oder mehrerer Proteine gemäß SEQ ID NO:4 und/oder SEQ ID NO:6 und SEQ ID NO:8 (CK II), 10 (14-3-3 epsilon), EED und/oder Fragmenten der-

selben zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Behandlung einer Erkrankung, die durch eine erhöhte Insulin-Synthese charakterisiert ist oder dieser einhergeht.

10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Erkrankung Diabetes ist.
11. Verwendung einer oder mehrerer Nukleinsäuren gemäß SEQ ID NO: 3 und/oder 5 und 7 oder 9 und/oder einer oder mehrerer für EED kodierender Nukleinsäuren zur Herstellung eines pharmazeutischen Präparates zur Modulation der Insulin-Synthese in einem Individuum.

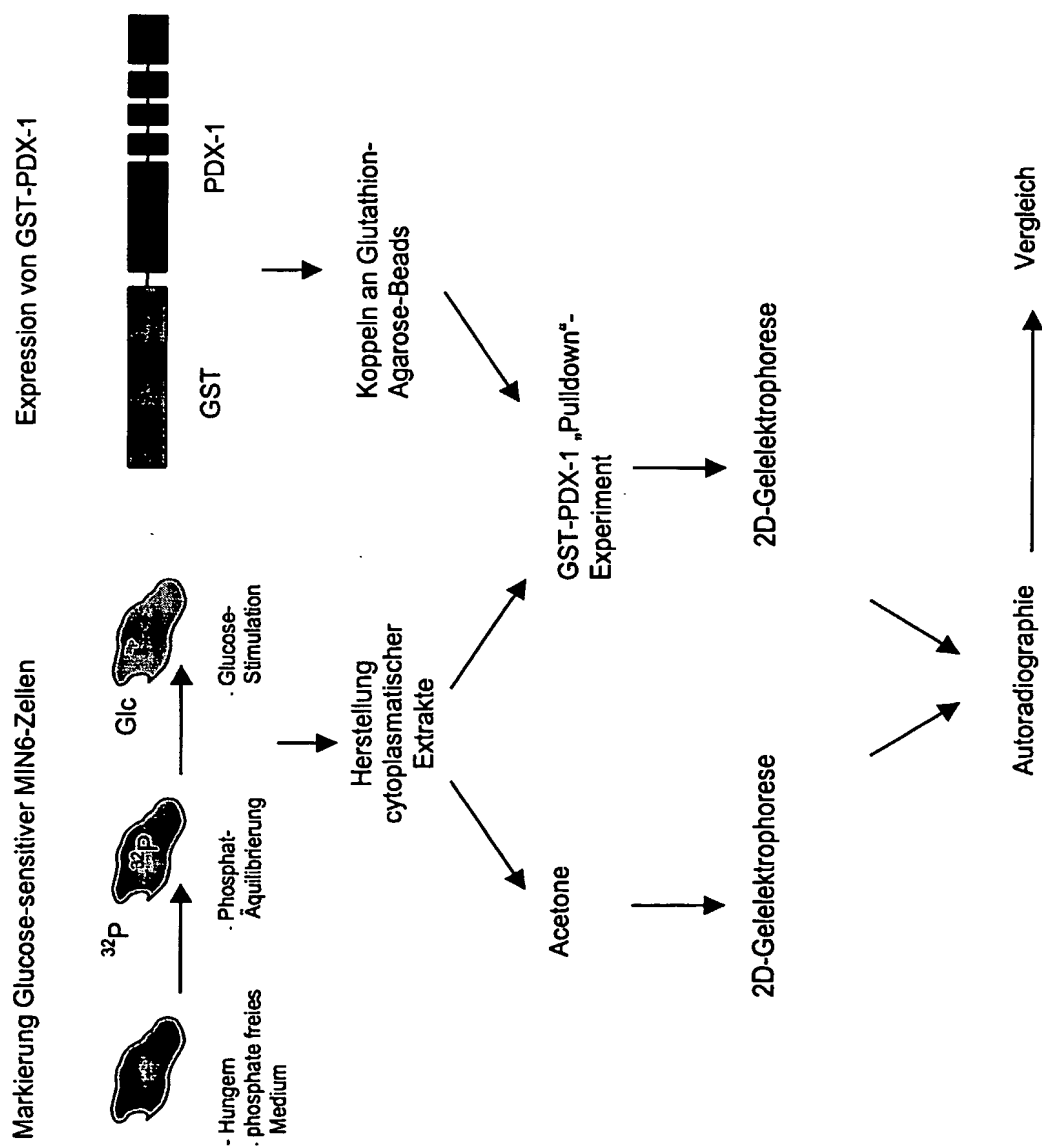
Fig. 1:

Fig. 2:

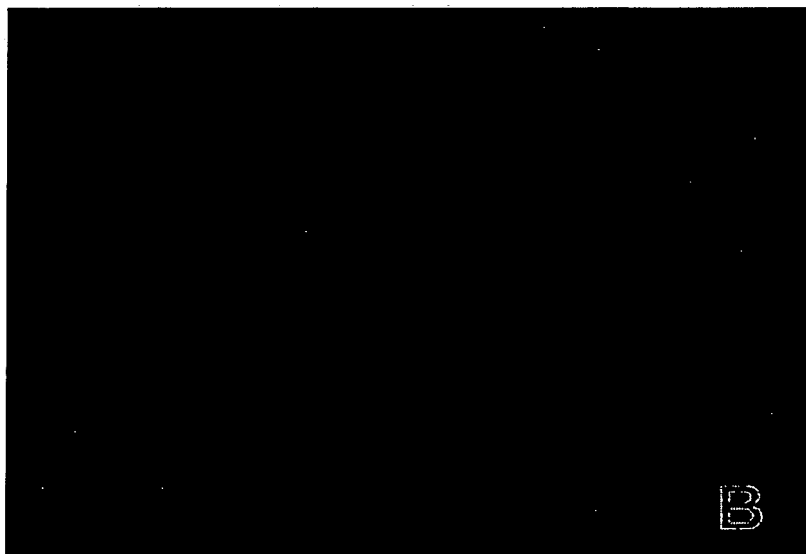
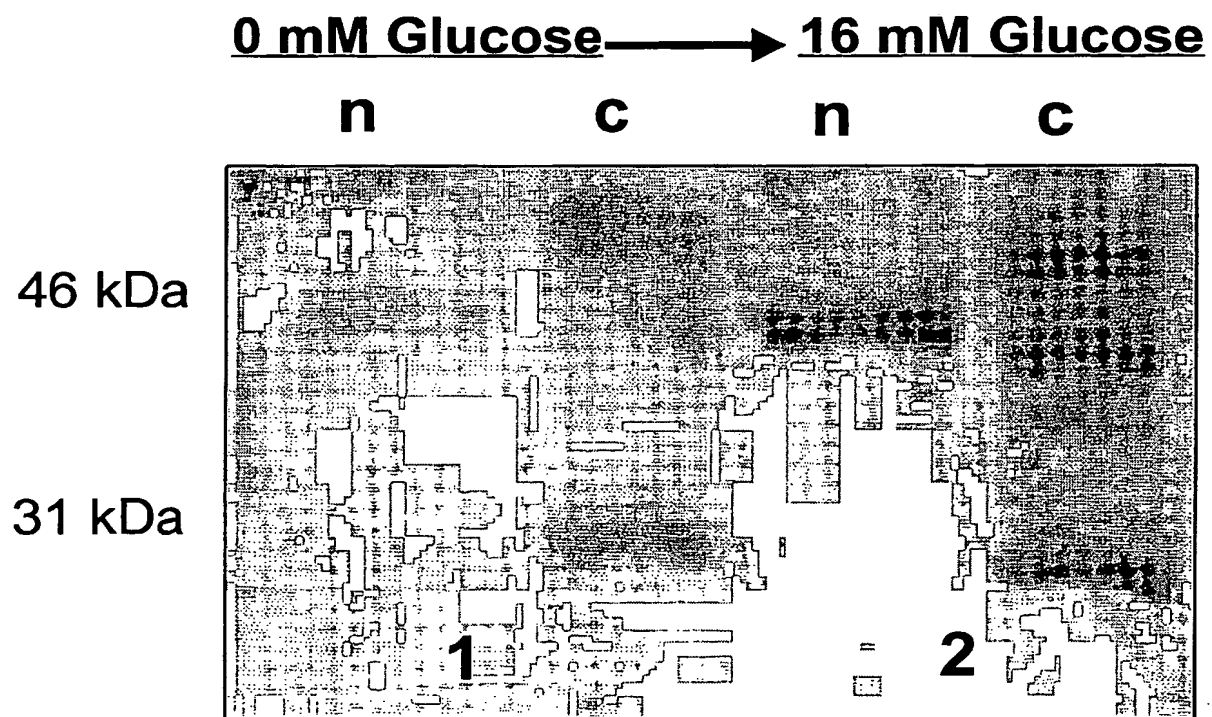


Fig. 3:

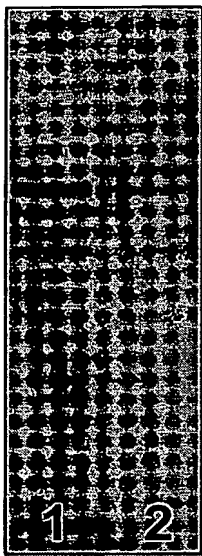
10/526468

4/17

Fig. 4:

75 kDa

60 kDa



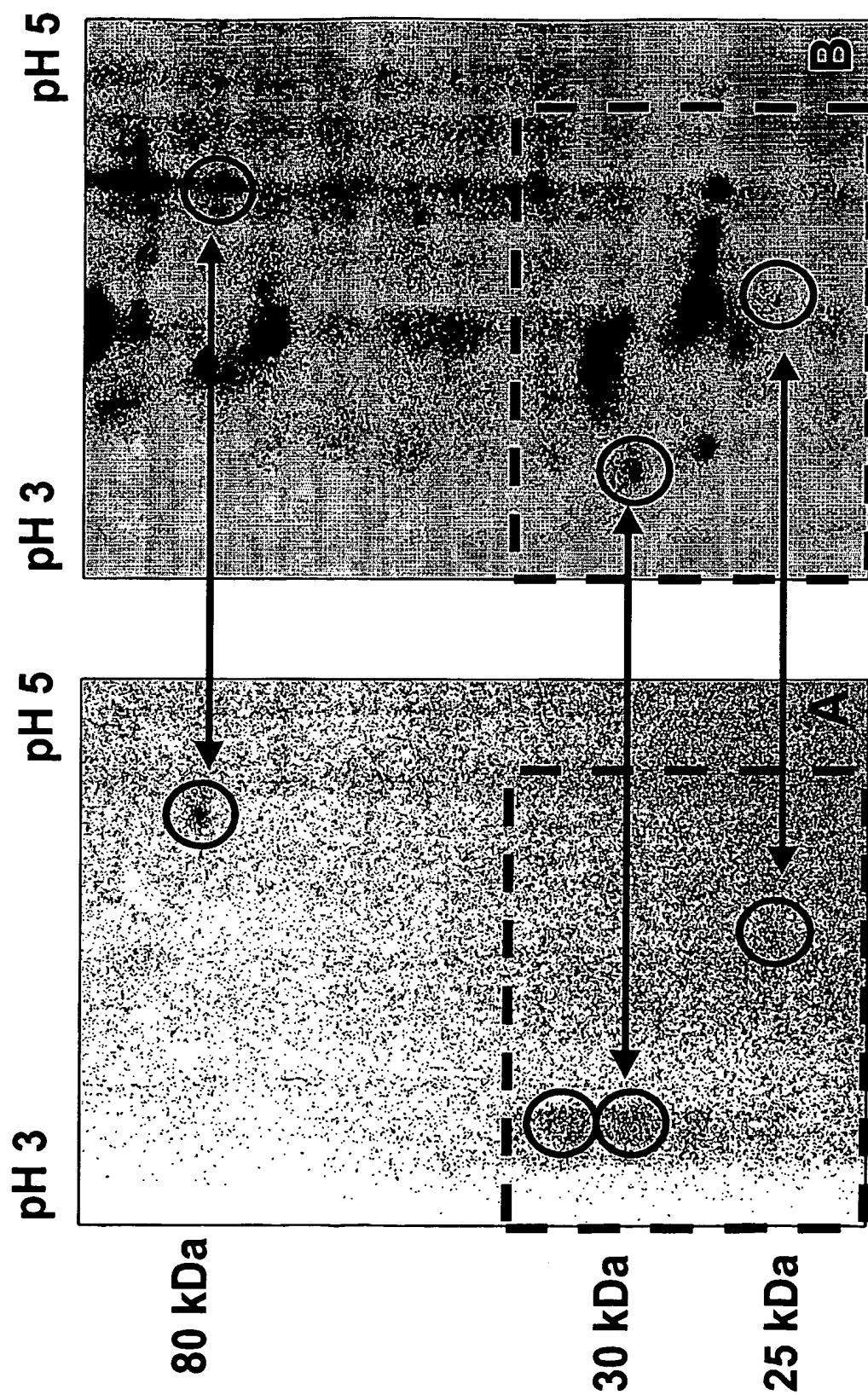
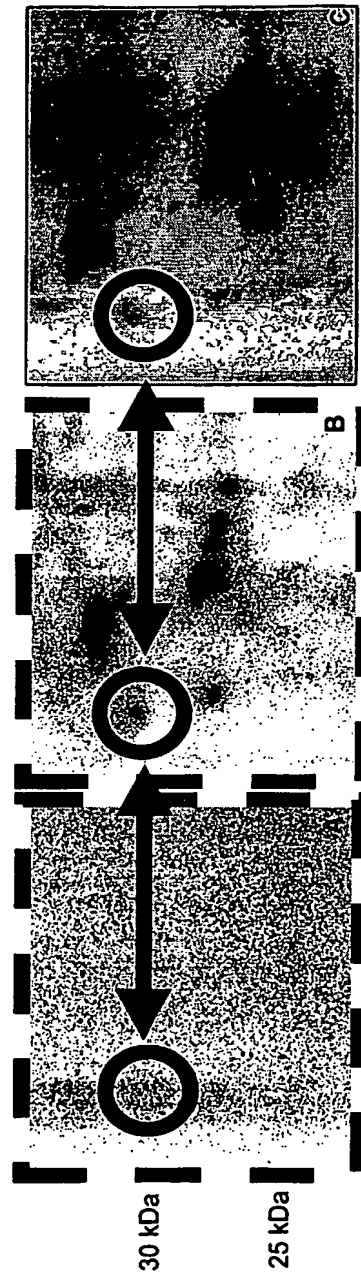


Fig. 5:

Fig. 6:



10/526468

Fig. 7:

7/17

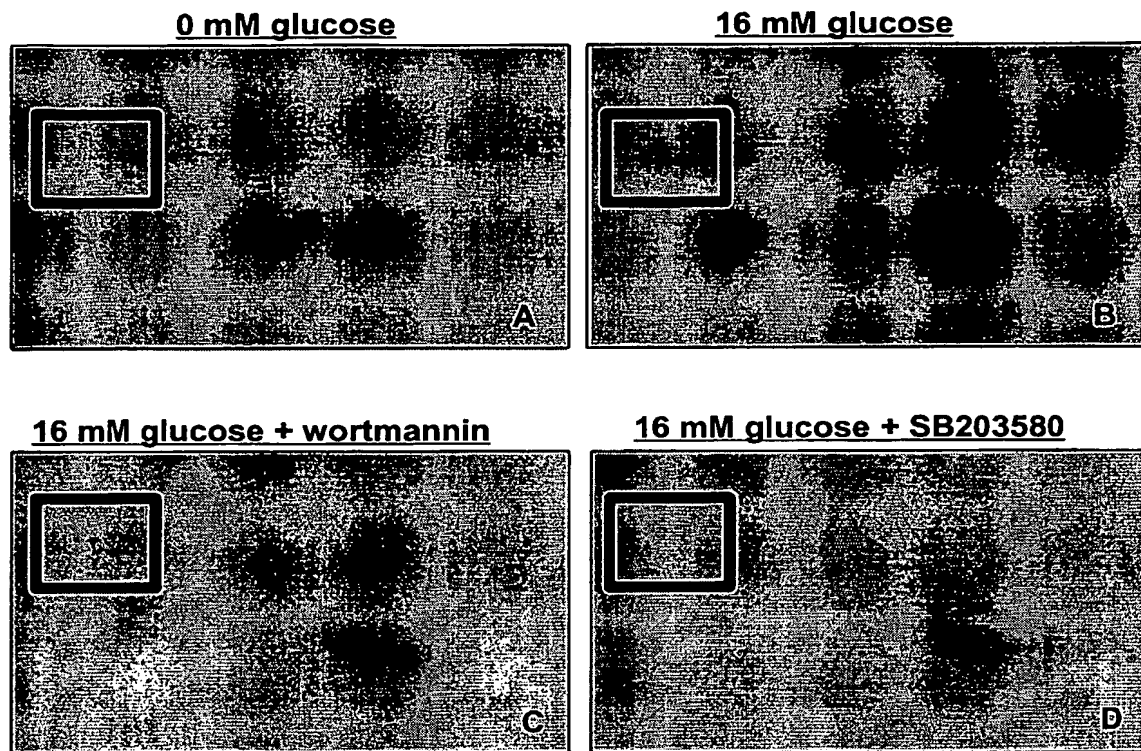


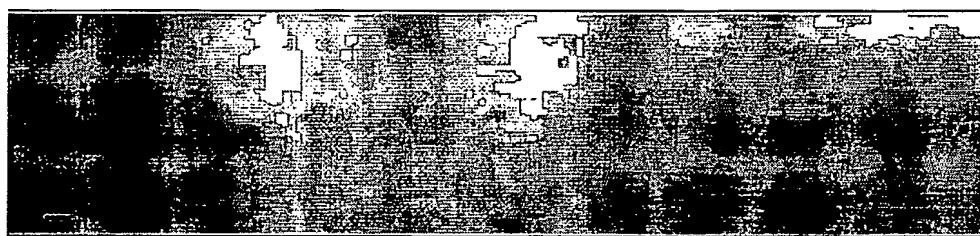
Fig. 8:

8/17

Rang	MOWSE Score	#(%) Massen- Übereinst.	MW (Protein) MW (Da)/pI	Name des Prote
1	615	7/30 (23%)	29174.1/4.63	(BC001440). tyrosin 3- monooxygenase/tryptophan 5- monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide (14-3-3 epsilon)

A

30 kDa



1

2

3

B

Fig. 9:

MNGEEQYYAATQLYKDPCAFQRGPAPEFSASPPACLYMGRQPPP
PPPHFFPGALGALEQGSPPDISPYEVPPLADDPVAHLHHHLPAQLALPHPPAGPFPE
GAEPGVLEEPNRVQLPPFWMKSTKAHAWKGQWAGGAYAAEPEENKRTRTAYTRAQLLE
LEKEFLFNKYISRPRVELAVMLNLTERHIKIWFQNRMRKWKKEEDKKRGGGTAVGGG
GVAEPEQDCAVTSGEELLALPPPPPPGGAVPPAAPVAAREGRLPPGLSASPQSSVAP
RRPQEPR

Aminosäuresequenz PDX-1;

283 Aminosäuren

Fig. 10:

10/17

```
atgaac ggcgaggagc agtactacgc ggccacgcag ctttacaagg
acctatgcgc gttccagcga ggcccggcgc cggagttcag cgccagcccc cctgcgtgcc
tgtacatggg ccgccagccc ccgccgccgc cgccgcaccc gtcccttggc gccctgggag
cgctggagca gggcagcccc ccggacatct ccccgtagca ggtgcccccc ctgcgcgacg
accccgcggt ggcgcacctt caccaccacc tcccgggtca gctcgcgctc cccacccgcg
ccgccggggc cttcccggag ggagccgagc cgggcgtcct ggaggagccc aaccgcgtcc
agctgccttt cccatggatg aagtctacca aagctcacgc gtggaaaggc cagtgggcag
gcggcgccca cgctgcggag ccggaggaga acaagcggac gcgcacggcc tacacgcgcg
cacagctgct agagctggag aaggagttcc tattcaacaa gtacatctca cggccgcgcc
gggtggagct ggctgtcatg ttgaacttga ccgagagaca catcaagatc tggttccaaa
accgccgcat gaagtggaaa aaggaggagg acaagaagcg cggcggcggg acagctgtcg
ggggtggcgg ggctgcggag cctgagcagg actgcgccgt gacctccggc gaggagcttc
tggcgctgcc gccgccgccg cccccggag gtgctgtgcc gcccgctgcc cccgttgccg
cccgagaggg ccgcctgccg cctggcctta gcgcgtcgcc acagccctcc agcgtcgcgc
ctcgggggcc gcaggaacca cgatga
```

PDX-1 kodierende Nukleotidsequenz;
852 Nukleotide; Nukleotide 850-852: Stopcodon

Fig. 11:

11/17

10/526468

MDDREDLVYQAKLAEQAERYDEMVESMKKVAGMDVELTVEERNL
LSVAYKNVIGARRASWRIISSIEQKEENKGGEDKMKMIREYRQMVETELKLICCDILD
VLDKHLIPAANTGESKVFYFKMGDYHRYLAEFATGNDRKEAAENSLVAYKAASDIAM
TELPPTHPIRLGLALNFSVFYIEILNSPDRACRLAKAAFDDAIAELDTLSEESYKDST
LIMQLLRDNLTLWTSDMQGDGEEQNKEALQDVEDENQ

Aminosäuresequenz von 14-3-3 epsilon;
255 Aminosäuren

Fig. 12:

12/17

10/526468

```
atggatgac gagaggatct ggtgtaccag gcgaagctgg ccgagcaggc tgagcgatac
gacgaaatgg tggagtcaat gaagaaagta gcagggatgg atgtggagct gacagttgaa
gaaagaaacc tcctatctgt tgcatataag aatgtgattg gagctagaag agcctcctgg
agaataatca gcagcattga acagaaagaa gaaaacaagg gaggagaaga caagctaaaa
atgattcggg aatatcggca aatggttgag actgagctaa agttaatctg ttgtgacatt
ctggatgtac tggacaaaca cctcattcca gcagctaaca ctggcgagtc caagggtttc
tattataaaa tgaaagggga ctaccacagg tatctggcag aatttgccac aggaaacgac
aggaaggagg ctgcggagaa cagcctagt gcttataaag ctgctagtga tattgcaatg
acagaacttc caccaacgca tcctattcgc ttaggtcttg ctctcaattt ttccgtattc
tactacgaaa ttcttaattc ccctgaccgt gcctgcaggt tggcaaaagc agcttttgat
gatgcaattg cagaactgga tacgctgagt gaagaaagct ataaggactc tacacttatc
atgcagttgt tacgtgataa tctgacacta tggacttcag acatgcaggg tgacggtgaa
gagcagaata aagaagcgct gcaggacgtg gaagacgaaa atcagtga
```

14-3-3 epsilon kodierende Nukleotidsequenz;
768 Nukleotide; Nukleotide 766-768: Stopcodon

Fig. 13:**a)**

MPGPAAGSRARVYAEVNSLSREYWDYEAHVPSWGNQDDYQLVR
KLGRGKYSEVFEAINITNNERVVVKILKPVKKKKIKREVKILENLRGGTNI IKLIDTV
KDPVSKTPALVF EYINNTDFKQLYQILTDFDIRFMYELLKALDYCHSKGIMHRDVKP
HNV MIDHQQKKLRLIDWGLAEFYHPAQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWS
LGCMLASMI FRREPFFHGDNYDQLVRIAKVLGTEELYGYLKKYHIDLDPHFNDILGQ
HSRKRWENFIHSENRLV SPEALDLLDKLLRYDHQQRLTAKEAMEHPYFYPVVKEQSQ
PCADNAVLSSGLTAAR

Aminosäuresequenz von CK II-Untereinheit alpha';

350 Aminosäuren

b)

MSGPVPSRARVYTDVNTHRPREYWDYESHVVEWGNQDDYQLVRK
LGRGKYSEVFEAINITNNEKVVVKILKPVKKKKIKREIKILENLRGGPNII TLADIVK
DPVSRTPALVF EHVNNTDFKQLYQTLTDYDIRFMYEILKALDYCHSMGIMHRDVKPH
NVMIDHEHRKLRLIDWGLAEFYHPGQEYNVRVASRYFKGPELLVDYQMYDYSLDMWSL
GCMLASMI FRKEPFFHGHNDYDQLVRIAKVLGTEDLYDYIDKYNIELDPRFNDILGRH
SRKRWERFVHSENQHLV SPEALDFLDKLLRYDHQSRLTAREAMEHPYFYTVVKDQARM
GSSSMPGGSTPVSSANMMSGISSVPTPSPLGPLAGSPVIAAANPLGMPVPAAAGAQQ

Aminosäuresequenz von CK II-Untereinheit alpha;

391 Aminosäuren

c)

MSSSEEVSWISWFCGLRGNEFFCEVDEDDYIQDKFNLTGLNEQVP
HYRQALDMILDLEPDEELEDNPNQSDLIEQAAEMLYGLIHARYILTNRGIAQM LEKYQ
QGDFGYCPRVYCENQPM LPIGLSDIPGEAMVKLYCPKCMDVYTPKSSRHHTDGAYFG
TGFPHMLFMVHPEYRPKR PANQFVPRLYGFKIHPMAYQLQLQAASNFKSPVKTIR

Aminosäuresequenz von CK II-Untereinheit beta;

215 Aminosäuren

Fig. 14:

14/17

10/526468**a)**

```

                                atgcccc gccccggccgc
gggcagcagg gccccgggtct acgccgaggt gaacagtctg aggagccgcg agtactggga
ctacgaggct cagctcccga gctggggtaa tcaagatgat taccaactgg ttcgaaaact
tggtcgggga aaatatagtg aagtatttga ggccattaat atcaccaaca atgagagagt
ggttgtaaaa atcctgaagc cagtgaagaa aaagaagata aaacgagagg ttaagattct
ggagaacctt cgtggtggaa caaatatcat taagctgatt gacactgtaa aggacccccgt
gtcaaagaca ccagcttttg tatttgaata tatcaataat acagatttta agcaactcta
ccagatcctg acagactttg atatccggtt ttatatgtat gaactactta aagctctgga
ttactgccac agcaaggga tcatgcacag ggatgtgaaa cctcacaatg tcatgataga
tcaccaacag aaaaagctgc gactgataga ttgggggtctg gcagaattct atcatcctgc
tcaggagtac aatgttcgtg tagcctcaag gtacttcaag ggaccagagc tcctcgtgga
ctatcagatg tatgattata gcttggacat gtggagtttg ggctgtatgt tagcaagcat
gatctttcga aggggaacct tcttccatgg acaggacaac tatgaccagc ttgttcgcat
tgccaagggt ctgggtacag aagaactgta tgggtatctg aagaagtatc acatagacct
agatccacac ttcaacgata tcctgggaca acattcacgg aaacgctggg aaaactttat
ccatagttag aacagacacc ttgtcagccc tgaggcccta gatcttctgg acaaacttct
gcgatacgac catcaacaga gactgactgc caaagaggcc atggagcacc catacttcta
ccctgtggtg aaggagcagt cccagccttg tgcagacaat gctgtgcttt ccagtgggtct
cacggcagca cgatga

```

CK II alpha'-kodierende Nukleotidsequenz;
 1053 Nukleotide; Nukleotide 1051-1053: Stopcodon

b)

```

                                at gtcgggaccc gtgccaagca gggccagagt
ttacacagat gttaatacac acagacctcg agaatactgg gattacgagt cacatgtggt
ggaatgggga aatcaagatg actaccagct gggtcgaaaa ttaggccgag gtaaatacag
tgaagtattt gaagccatca acatcacaaa taatgaaaaa gttgttgta aaattctcaa
gccagtaaaa aagaagaaaa ttaagcgtga aataaagatt ttggagaatt tgagaggagg
tcccaacatc atcacactgg cagacattgt aaaagaccct gtgtcacgaa cccccgcctt
ggtttttgaa caggtaaaca acacagactt caagcaattg taccagacgt taacagacta
tgatattcga ttttacatgt atgagattct gaaggccctg gattattgtc acagcatggg
aattatgcac agagatgtca agccccataa tgatcatgatt gatcatgagc acagaaagct
acgactaata gactgggggt ttggtgagtt ttatcatcct ggccaagaat ataattgtccg
agttgcttcc cgataactca aaggctcctga gctacttgta gactatcaga tgtacgatta
tagtttggtat atgtggagtt tgggttggtat gctggcaagt atgatcttcc ggaaggagcc
atttttccat ggacatgaca attatgatca gttggtgagg atagccaagg ttctggggac
agaagattta tatgactata ttgacaaata caacattgaa ttagatccac gtttcaatga
tatcttgggc agacactctc gaaagcgatg ggaacgcttt gtccacagtg aaaatcagca
ccttgctcagc cctgaggcct tggatttcct ggacaaaactg ctgcgatatg accaccagtc
acggcttact gcaagagagg caatggagca cccctatttc tactgttg tgaaggacca
ggctcgaatg ggttcatcta gcatgccagg gggcagtacg cccgtcagca gcgccaatat
gatgtcaggg atttcttcag tgccaacccc ttcaccctt ggacctctgg caggctcacc
agtgattgct gctgccaacc cccttgggat gcctgttcca gctgccgctg gcgctcagca
gtaacggccc

```

CK II alpha-kodierende Nukleotidsequenz;
 1182 Nukleotide; Nukleotide 1180-1182: Stopcodon

c)

```
          atgagca gctcagagga ggtgtcctgg atttcctggt tctgtgggct
ccgtggcaat gaattcttct gtgaagtgga tgaagactac atccaggaca aatttaatct
tactggactc aatgagcagg tccctcacta tcgacaagct ctagacatga tcttggacct
ggagcctgat gaagaactgg aagacaaccc caaccagagt gacctgattg agcaggcagc
cgagatgctt tatggattga tccacgcccg ctacatcctt accaaccgtg gcatcgccca
gatgttggaa aagtaccagc aaggagactt tggttactgt cctcgtgtgt actgtgagaa
ccagccaatg cttcccattg gcctttcaga catcccaggt gaagccatgg tgaagcteta
ctgccccaaag tgcattgatg tgtacacacc caagtcatca agacaccatc acacggatgg
cgctacttc ggcactggtt tccctcacat gctcttcatt gtgcatcccg agtaccggcc
caagagacct gcccaaccagt ttgtgcccag gctctacggt ttcaagatcc atccgatggc
ctaccagctg cagctccaag ccgccagcaa cttcaagagc ccagtcaaga cgattcgctg
a
```

CK II beta-kodierende Nukleotidsequenz;
648 Nukleotide; Nukleotide 646-648: Stopcodon

Fig. 15:

16/17

10/526468

MPAAKKQKLSSDENSNPELSGDENDDAVSIESGTINTERPDTPTN
TPNAPGRKSWGKGKWKSKKCKYSFKCVNSLKDHNQPLFGVQFNWHSKEGDPLVFATV
GSNRVTLYECHSQGEIRLLQSYVDADADENFYTCAWTYDSNTSHPLLAVAGSRGIIRI
INPITMQCIKHVYVGHGNAINELKFHPRDPNLLLSVSKDHALRLWNIQTDTLVAIFGGV
EGHRDEVLSADYDLLGEKIMSCGMDHSLKLWRINSKRMNAIKESYDYNPNKTNRPFI
SQKIHFPDFSTRDIHRNYVDCVRWLGDILLSKSCENAIVCWKPGKMEDDIDKIKPSES
NVTILGRFDYSQCDIWYMRFSMDFWQKMLALGNQVGKLYVWDLEVEDPHKAKCTTLTH
HKCGAAIRQTSFSRDSSILIAVCDDASIWRWDRLR

Aminosäuresequenz der kurzen EED-Isoform;

427 Aminosäuren

Fig. 16:

17/17

10/526468

```

                                atgcct gcggccaaga agcagaagct
gagcagtgc gagaacagca atccagaact ctctgggagac gagaatgatg acgctgtcag
tatagaaagt ggtacaaaca ctgaacgccc tgatacacct acaaacacgc caaatgcacc
tggaagggaa agttggggaa agggaaaatg gaagtcaaag aaatgcaaat attctttcaa
atgtgtaaat agtctcaagg aagatcataa ccaaccattg tttggagttc agtttaactg
gcacagtaaa gaaggagatc cattagtgtt tgcaactgta ggaagcaaca gagttacctt
gtatgaatgt cattcacaag gagaaatccg gttgttgcaa tcttacgtgg atgctgatgc
tgatgaaaac ttttacactt gtgcatggac ctatgatagc aatacgagcc atcctctgct
ggctgtagct ggatctagag gcataattag gataataaat cctataacaa tgcagtgtat
aaagcactat gttggccatg gaaatgctat caatgagctg aaattccatc caagagatcc
aaatcttctc ctgtcagtaa gtaaagatca tgctttacga ttatggaata tccagacgga
cactctggtg gcaatatttg gaggcgtaga agggcacaga gatgaagttc taagtgtcga
ttatgatctt ttgggtgaaa aaataatgtc ctgtggtatg gatcattctc ttaaactttg
gaggatcaat tcaaagagaa tgatgaatgc aattaaggaa tcttatgatt ataatccaaa
taaaactaac aggccattta tttctcagaa aatccatttt cctgattttt ctaccagaga
catacatagg aattatgttg attgtgtgcg atggttaggc gatttgatac tttctaagtc
ttgtgaaaat gccattgtgt gctggaaacc tggcaagatg gaagatgata tagataaaat
taaaccagtg gaatctaatt tgactattct tgggcgattt gattacagcc agtgtgacat
ttggtacatg aggttttcta tggatttctg gcaaaagatg cttgcattgg gcaatcaagt
tggcaaactt tatgtttggg atttagaagt agaagatcct cataaagcca aatgtacaac
actgactcat cataaatgtg gtgctgctat tgcacaaacc agtttttagca gggatagcag
cattcttata gctgtttgtg atgatgccag tatttggcgc tgggatcgac ttcgataa
```

Nukleotidsequenz, die für die kurze EED-Isoform kodiert;
1284 Nukleotide; Nukleotide 1282-1284: Stopcodon

<110> Ernst-Moritz-Arndt Universität Greifswald

<120> Modulation der Insulinsynthese

<130> P 64322

<160> 12

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 852

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Stopcodon

<222> (850)..(852)

<223> Nukleotidsequenz von PDX-1

<400> 1

atgaacggcg aggagcagta ctacgcggcc acgcagcttt acaaggaccc atgcgcgttc	60
cagcgaggcc cggcgccgga gttcagcgcc agccccctg cgtgcctgta catgggcccgc	120
cagccccgc cgccgccgc gcacccgttc cctggcgccc tgggcgcgct ggagcagggc	180
agccccccgg acatctcccc gtacgaggtg cccccctcg ccgacgaccc cgcggtggcg	240
caccttcacc accacctccc ggctcagctc gcgctcccc acccgcccgc cgggcccttc	300
ccggagggag ccgagccggg cgtcctggag gagcccaacc gcgtccagct gcctttccca	360
tggatgaagt ctaccaaagc tcacgcgtgg aaaggccagt gggcaggcgg cgcctacgct	420
gcggagccgg aggagaacaa gcggacgcgc acggcctaca cgcgcgcaca gctgctagag	480
ctggagaagg agttcctatt caacaagtac atctcacggc cgcgccgggt ggagctggct	540
gtcatgttga acttgaccga gagacacatc aagatctggt tccaaaaccg ccgcatgaag	600
tggaaaaagg aggaggacaa gaagcgcggc ggcgggacag ctgtcggggg tggcggggtc	660
gcggagcctg agcaggactg cgccgtgacc tccggcgagg agcttctggc gctgccgccg	720
ccgcccccc ccggaggtgc tgtgccgcc gctgccccg ttgccgccg agagggccgc	780
ctgccgctg gcttagcgc gtcgccacag ccctccagcg tcgcgcctcg gcggccgcag	840
gaaccacgat ga	852

<210> 2
 <211> 283
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<223> Aminosäuresequenz von PDX-1

<400> 2

Met Asn Gly Glu Glu Gln Tyr Tyr Ala Ala Thr Gln Leu Tyr Lys Asp
 1 5 10 15

Pro Cys Ala Phe Gln Arg Gly Pro Ala Pro Glu Phe Ser Ala Ser Pro
 20 25 30

Pro Ala Cys Leu Tyr Met Gly Arg Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro His
 35 40 45

Pro Phe Pro Gly Ala Leu Gly Ala Leu Glu Gln Gly Ser Pro Pro Asp
 50 55 60

Ile Ser Pro Tyr Glu Val Pro Pro Leu Ala Asp Asp Pro Ala Val Ala
 65 70 75 80

His Leu His His His Leu Pro Ala Gln Leu Ala Leu Pro His Pro Pro
 85 90 95

Ala Gly Pro Phe Pro Glu Gly Ala Glu Pro Gly Val Leu Glu Glu Pro
 100 105 110

Asn Arg Val Gln Leu Pro Phe Pro Trp Met Lys Ser Thr Lys Ala His
 115 120 125

Ala Trp Lys Gly Gln Trp Ala Gly Gly Ala Tyr Ala Ala Glu Pro Glu
 130 135 140

Glu Asn Lys Arg Thr Arg Thr Ala Tyr Thr Arg Ala Gln Leu Leu Glu
 145 150 155 160

Leu Glu Lys Glu Phe Leu Phe Asn Lys Tyr Ile Ser Arg Pro Arg Arg
 165 170 175

Val Glu Leu Ala Val Met Leu Asn Leu Thr Glu Arg His Ile Lys Ile
 180 185 190

Trp Phe Gln Asn Arg Arg Met Lys Trp Lys Lys Glu Glu Asp Lys Lys
 195 200 205

Arg Gly Gly Gly Thr Ala Val Gly Gly Gly Gly Val Ala Glu Pro Glu
 210 215 220

Gln Asp Cys Ala Val Thr Ser Gly Glu Glu Leu Leu Ala Leu Pro Pro
 225 230 235 240

Pro Pro Pro Pro Gly Gly Ala Val Pro Pro Ala Ala Pro Val Ala Ala
 245 250 255

Arg. Glu Gly Arg Leu Pro Pro Gly Leu Ser Ala Ser Pro Gln Pro Ser
 260 265 270

Ser Val Ala Pro Arg Arg Pro Gln Glu Pro Arg
 275 280

<210> 3

<211> 1182

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<220>

<221> Stopcodon

<222> (1080)..(1082)

<223> Nukleotidsequenz von CKII-Untereinheit alpha

<400> 3

atgtcgggac ccgtgccaaag cagggccaga gtttacacag atgttaatac acacagacct 60
 cgagaatact gggattacga gtcacatgtg gtggaatggg gaaatcaaga tgactaccag 120
 ctggtttcgaa aattaggccg aggtaaatac agtgaagtat ttgaagccat caacatcaca 180
 aataatgaaa aagttgttgt taaaattctc aagccagtaa aaaagaagaa aattaagcgt 240
 gaaataaaga ttttgagaaa tttgagagga ggtcccaaca tcatcacact ggcagacatt 300
 gtaaaagacc ctgtgtcacg aacccccgcc ttgggttttg aacacgtaaa caacacagac 360
 ttcaagcaat tgtaccagac gttaacagac tatgatattc gattttacat gtatgagatt 420
 ctgaaggccc tggattattg tcacagcatg ggaattatgc acagagatgt caagccccat 480
 aatgtcatga ttgatcatga gcacagaaaag ctacgactaa tagactgggg tttggctgag 540
 ttttatcatc ctggccaaga atataatgtc cgagttgctt cccgatactt caaaggctcct 600
 gagctacttg tagactatca gatgtacgat tatagtttgg atatgtggag tttgggttgt 660
 atgctggcaa gtatgatctt tcggaaggag ccatttttcc atggacatga caattatgat 720
 cagttggtga ggatagccaa ggttctgggg acagaagatt tatatgacta tattgacaaa 780
 tacaacattg aattagatcc acgtttcaat gatattcttg gcagacactc tcgaaagcga 840
 tgggaacgct ttgtccacag tgaaaatcag caccttgta gccctgaggg cttggatttc 900
 ctggacaaac tgctgcgata tgaccaccag tcacggctta ctgcaagaga ggcaatggag 960
 cacccttatt tctacactgt tgtgaaggac caggctcgaa tgggttcac tagcatgcca 1020

```

gggggcagta cgcccgctcag cagcgccaat atgatgtcag ggattttcttc agtgccaacc 1080
ccttcacccc ttggacctct ggagggctca ccagtgattg ctgctgcaa ccccttggg 1140
atgcctgttc cagctgccgc tggcgctcag cagtaacggc cc 1182

```

<210> 4

<211> 391

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<223> Aminosäuresequenz von CKII-Untereinheit alpha

<400> 4

```

Met Ser Gly Pro Val Pro Ser Arg Ala Arg Val Tyr Thr Asp Val Asn
1           5           10           15

```

```

Thr His Arg Pro Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ser His Val Val Glu
          20           25           30

```

```

Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg Gly
35           40           45

```

```

Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu Lys
50           55           60

```

```

Val Val Val Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys Arg
65           70           75           80

```

```

Glu Ile Lys Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly Gly Pro Asn Ile Ile Thr
85           90           95

```

```

Leu Ala Asp Ile Val Lys Asp Pro Val Ser Arg Thr Pro Ala Leu Val
100          105          110

```

```

Phe Glu His Val Asn Asn Thr Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Thr Leu
115          120          125

```

```

Thr Asp Tyr Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr Glu Ile Leu Lys Ala Leu
130          135          140

```

```

Asp Tyr Cys His Ser Met Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro His
145          150          155          160

```

```

Asn Val Met Ile Asp His Glu His Arg Lys Leu Arg Leu Ile Asp Trp
165          170          175

```

Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro Gly Gln Glu Tyr Asn Val Arg Val
180 185 190

Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln Met
195 200 205

Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala Ser
210 215 220

Met Ile Phe Arg Lys Glu Pro Phe Phe His Gly His Asp Asn Tyr Asp
225 230 235 240

Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly Thr Glu Asp Leu Tyr Asp
245 250 255

Tyr Ile Asp Lys Tyr Asn Ile Glu Leu Asp Pro Arg Phe Asn Asp Ile
260 265 270

Leu Gly Arg His Ser Arg Lys Arg Trp Glu Arg Phe Val His Ser Glu
275 280 285

Asn Gln His Leu Val Ser Pro Glu Ala Leu Asp Phe Leu Asp Lys Leu
290 295 300

Leu Arg Tyr Asp His Gln Ser Arg Leu Thr Ala Arg Glu Ala Met Glu
305 310 315 320

His Pro Tyr Phe Tyr Thr Val Val Lys Asp Gln Ala Arg Met Gly Ser
325 330 335

Ser Ser Met Pro Gly Gly Ser Thr Pro Val Ser Ser Ala Asn Met Met
340 345 350

Ser Gly Ile Ser Ser Val Pro Thr Pro Ser Pro Leu Gly Pro Leu Ala
355 360 365

Gly Ser Pro Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Leu Gly Met Pro Val Pro
370 375 380

Ala Ala Ala Gly Ala Gln Gln
385 390

<210> 5
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

 <220>
 <221> Stopcodon
 <222> (1051)..(1053)
 <223> Nukleotidsequenz von CKII-Untereinheit alpha'

```

<400> 5
atgcccgccc cggccgcggg cagcagggcc cgggtctacg ccgaggtgaa cagtctgagg      60
agccgcgagt actgggacta cgaggctcac gtcccgagct ggggtaatca agatgattac      120
caactgggttc gaaaacttgg tcggggaaaa tatagtgaag tatttgaggc cattaatatc      180
accaacaatg agagagtggg tgtaaaaatc ctgaagccag tgaagaaaaa gaagataaaa      240
cgagagggtta agattctgga gaaccttcgt ggtggaacaa atatcattaa gctgattgac      300
actgtaaagg acccctgtgc aaagacacca gcttttggtat ttgaatatat caataatata      360
gattttaagc aactctacca gatcctgaca gactttgata tccggtttta tatgtatgaa      420
ctacttaaag ctctggatta ctgccacagc aagggaatca tgcacaggga tgtgaaacct      480
cacaatgtca tgatagatca ccaacagaaa aagctgcgac tgatagattg gggctctggca      540
gaattctatc atcctgtctc ggagtacaat gttcgtgtag cctcaaggta cttcaaggga      600
ccagagctcc tcgtggacta tcagatgtat gattatagct tggacatgtg gagtttgggc      660
tgtatgttag caagcatgat ctttcgaagg gaaccattct tccatggaca ggacaactat      720
gaccagcttg ttgcattgc caaggttctg ggtacagaag aactgtatgg gtatctgaag      780
aagtatcaca tagacctaga tccacacttc aacgatatcc tgggacaaca ttcacggaaa      840
cgctgggaaa actttatcca tagtgagaac agacaccttg tcagccctga ggccctagat      900
cttctggaca aacttctgcg atacgaccat caacagagac tgactgcaa agaggccatg      960
gagcaccat acttctaccc tgtggtgaag gagcagtcac agccttgtgc agacaatgct     1020
gtgctttcca gtggtctcac ggcagcacga tga                                     1053
  
```

<210> 6
 <211> 350
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

 <223> Aminosäuresequenz von CKII-Untereinheit alpha'

```

<400> 6
Met Pro Gly Pro Ala Ala Gly Ser Arg Ala Arg Val Tyr Ala Glu Val
1          5          10          15
  
```


Asn Ser Leu Arg Ser Arg Glu Tyr Trp Asp Tyr Glu Ala His Val Pro
20 25 30

Ser Trp Gly Asn Gln Asp Asp Tyr Gln Leu Val Arg Lys Leu Gly Arg
35 40 45

Gly Lys Tyr Ser Glu Val Phe Glu Ala Ile Asn Ile Thr Asn Asn Glu
50 55 60

Arg Val Val Val Lys Ile Leu Lys Pro Val Lys Lys Lys Lys Ile Lys
65 70 75 80

Arg Glu Val Lys Ile Leu Glu Asn Leu Arg Gly Gly Thr Asn Ile Ile
85 90 95

Lys Leu Ile Asp Thr Val Lys Asp Pro Val Ser Lys Thr Pro Ala Leu
100 105 110

Val Phe Glu Tyr Ile Asn Asn Thr Asp Phe Lys Gln Leu Tyr Gln Ile
115 120 125

Leu Thr Asp Phe Asp Ile Arg Phe Tyr Met Tyr Glu Leu Leu Lys Ala
130 135 140

Leu Asp Tyr Cys His Ser Lys Gly Ile Met His Arg Asp Val Lys Pro
145 150 155 160

His Asn Val Met Ile Asp His Gln Gln Lys Lys Leu Arg Leu Ile Asp
165 170 175

Trp Gly Leu Ala Glu Phe Tyr His Pro Ala Gln Glu Tyr Asn Val Arg
180 185 190

Val Ala Ser Arg Tyr Phe Lys Gly Pro Glu Leu Leu Val Asp Tyr Gln
195 200 205

Met Tyr Asp Tyr Ser Leu Asp Met Trp Ser Leu Gly Cys Met Leu Ala
210 215 220

Ser Met Ile Phe Arg Arg Glu Pro Phe Phe His Gly Gln Asp Asn Tyr
225 230 235 240

Asp Gln Leu Val Arg Ile Ala Lys Val Leu Gly Thr Glu Glu Leu Tyr
245 250 255

Gly Tyr Leu Lys Lys Tyr His Ile Asp Leu Asp Pro His Phe Asn Asp
260 265 270

Ile Leu Gly Gln His Ser Arg Lys Arg Trp Glu Asn Phe Ile His Ser
 275 280 285

Glu Asn Arg His Leu Val Ser Pro Glu Ala Leu Asp Leu Leu Asp Lys
 290 295 300

Leu Leu Arg Tyr Asp His Gln Gln Arg Leu Thr Ala Lys Glu Ala Met
 305 310 315 320

Glu His Pro Tyr Phe Tyr Pro Val Val Lys Glu Gln Ser Gln Pro Cys
 325 330 335

Ala Asp Asn Ala Val Leu Ser Ser Gly Leu Thr Ala Ala Arg
 340 345 350

<210> 7
 <211> 648
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens

<220>
 <221> Stopcodon
 <222> (646)..(648)
 <223> Nukleotidsequenz von CKII-Untereinheit beta

<400> 7
 atgagcagct cagaggaggt gtccctggatt tcctgggttct gtgggctccg tggcaatgaa 60
 ttcttctgtg aagtggatga agactacatc caggacaaat ttaatcttac tggactcaat 120
 gagcaggtcc ctactatcg acaagctcta gacatgatct tggacctgga gcctgatgaa 180
 gaactggaag acaaccccaa ccagagtga ctaggtgagc aggcagccga gatgctttat 240
 ggattgatcc acgcccgcta catcettacc aaccgtggca tcgcccagat gttggaaaag 300
 taccagcaag gagactttgg ttactgtcct cgtgtgtact gtgagaacca gccaatgctt 360
 cccattggcc ttccagacat cccaggtgaa gccatggtga agctctactg cccaagtgc 420
 atggatgtgt acacacccaa gtcacaaaga caccatcaca cggatggcgc ctacttcggc 480
 actggtttcc ctacatgct cttcatggtg catcccgagt accggcccaa gagacctgcc 540
 aaccagtttg tgcccaggct ctacggtttc aagatccatc cgatggccta ccagctgcag 600
 ctccaagccg ccagcaactt caagagccca gtcaagacga ttcgctga 648

<210> 8
 <211> 215
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens.

<223> Aminosäuresequenz von CKII-Untereinheit beta

<400> 8

Met Ser Ser Ser Glu Glu Val Ser Trp Ile Ser Trp Phe Cys Gly Leu
 1 5 10 15

Arg Gly Asn Glu Phe Phe Cys Glu Val Asp Glu Asp Tyr Ile Gln Asp
 20 25 30

Lys Phe Asn Leu Thr Gly Leu Asn Glu Gln Val Pro His Tyr Arg Gln
 35 40 45

Ala Leu Asp Met Ile Leu Asp Leu Glu Pro Asp Glu Glu Leu Glu Asp
 50 55 60

Asn Pro Asn Gln Ser Asp Leu Ile Glu Gln Ala Ala Glu Met Leu Tyr
 65 70 75 80

Gly Leu Ile His Ala Arg Tyr Ile Leu Thr Asn Arg Gly Ile Ala Gln
 85 90 95

Met Leu Glu Lys Tyr Gln Gln Gly Asp Phe Gly Tyr Cys Pro Arg Val
 100 105 110

Tyr Cys Glu Asn Gln Pro Met Leu Pro Ile Gly Leu Ser Asp Ile Pro
 115 120 125

Gly Glu Ala Met Val Lys Leu Tyr Cys Pro Lys Cys Met Asp Val Tyr
 130 135 140

Thr Pro Lys Ser Ser Arg His His His Thr Asp Gly Ala Tyr Phe Gly
 145 150 155 160

Thr Gly Phe Pro His Met Leu Phe Met Val His Pro Glu Tyr Arg Pro
 165 170 175

Lys Arg Pro Ala Asn Gln Phe Val Pro Arg Leu Tyr Gly Phe Lys Ile
 180 185 190

His Pro Met Ala Tyr Gln Leu Gln Leu Gln Ala Ala Ser Asn Phe Lys
 195 200 205

Ser Pro Val Lys Thr Ile Arg
210 215

<210> 9
<211> 768
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<220>
<221> Stopcodon
<222> (766)..(768)
<223> Nukleotidsequenz von 14-3-3 epsilon

<400> 9
atggatgac gagaggatct ggtgtaccag gcgaagctgg ccgagcaggc tgagcgatac 60
gacgaaatgg tggagtcaat gaagaaagta gcagggatgg atgtggagct gacagttgaa 120
gaaagaaacc tcctatctgt tgcataataa aatgtgattg gagctagaag agcctcctgg 180
agaataatca gcagcattga acagaaagaa gaaaacaagg gaggagaaga caagctaaaa 240
atgattcggg aatatcggca aatggttgag actgagctaa agttaatctg ttgtgacatt 300
ctggatgtac tggacaaaca cctcattcca gcagctaaca ctggcgagtc caagggtttc 360
tattataaaa tgaaagggga ctaccacagg tatctggcag aatttgccac aggaaacgac 420
aggaaggagg ctgcggagaa cagcctagtg gcttataaag ctgctagtga tattgcaatg 480
acagaacttc caccaacgca tcctattcgc ttaggtcttg ctctcaattt ttccgtattc 540
tactacgaaa ttcttaattc cctgaccgt gcctgcaggt tggcaaaagc agcttttgat 600
gatgcaattg cagaactgga tacgctgagt gaagaaagct ataaggactc tacacttatc 660
atgcagttgt tacgtgataa tctgacacta tggacttcag acatgcaggg tgacggtgaa 720
gagcagaata aagaagcgct gcaggacgtg gaagacgaaa atcagtga 768

<210> 10
<211> 255
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<223> Aminosäuresequenz von 14-3-3 epsilon

<400> 10
Met Asp Asp Arg Glu Asp Leu Val Tyr Gln Ala Lys Leu Ala Glu Gln
1 5 10 15

Ala Glu Arg Tyr Asp Glu Met Val Glu Ser Met Lys Lys Val Ala Gly
20 25 30

Met Asp Val Glu Leu Thr Val Glu Glu Arg Asn Leu Leu Ser Val Ala
35 40 45

Tyr Lys Asn Val Ile Gly Ala Arg Arg Ala Ser Trp Arg Ile Ile Ser
50 55 60

Ser Ile Glu Gln Lys Glu Glu Asn Lys Gly Gly Glu Asp Lys Leu Lys
65 70 75 80

Met Ile Arg Glu Tyr Arg Gln Met Val Glu Thr Glu Leu Lys Leu Ile
85 90 95

Cys Cys Asp Ile Leu Asp Val Leu Asp Lys His Leu Ile Pro Ala Ala
100 105 110

Asn Thr Gly Glu Ser Lys Val Phe Tyr Tyr Lys Met Lys Gly Asp Tyr
115 120 125

His Arg Tyr Leu Ala Glu Phe Ala Thr Gly Asn Asp Arg Lys Glu Ala
130 135 140

Ala Glu Asn Ser Leu Val Ala Tyr Lys Ala Ala Ser Asp Ile Ala Met
145 150 155 160

Thr Glu Leu Pro Pro Thr His Pro Ile Arg Leu Gly Leu Ala Leu Asn
165 170 175

Phe Ser Val Phe Tyr Tyr Glu Ile Leu Asn Ser Pro Asp Arg Ala Cys
180 185 190

Arg Leu Ala Lys Ala Ala Phe Asp Asp Ala Ile Ala Glu Leu Asp Thr
195 200 205

Leu Ser Glu Glu Ser Tyr Lys Asp Ser Thr Leu Ile Met Gln Leu Leu
210 215 220

Arg Asp Asn Leu Thr Leu Trp Thr Ser Asp Met Gln Gly Asp Gly Glu
225 230 235 240

Glu Gln Asn Lys Glu Ala Leu Gln Asp Val Glu Asp Glu Asn Gln
245 250 255

<210> 11
 <211> 1284
 <212> DNA
 <213> Homo sapiens.

<220>
 <221> Stopcodon
 <222> (1282)..(1284)
 <223> Nukleotidsequenz der kurzen Isoform von EED

<400> 11
 atgcctgCGG ccaagaagca gaagctgagc agtgacgaga acagcaatcc agaactctct 60
 ggagacgaga atgatgacgc tgtcagtata gaaagtggta caaacactga acgccctgat 120
 acacctacaa acacgccaaa tgcacctgga aggaaaagt ggggaaaggg aaaatggaag 180
 tcaaagaaat gcaaatattc tttaaagtgt gtaaatagtc tcaaggaaga tcataaccaa 240
 ccattgtttg gagttcagtt taactggcac agtaaagaag gagatccatt agtgtttgca 300
 actgtaggaa gcaacagagt taccttgtat gaatgtcatt cacaaggaga aatccggttg 360
 ttgcaatctt acgtggatgc tgatgctgat gaaaactttt acacttgtgc atggacctat 420
 gatagcaata cgagccatcc tctgctggct gtagctggat ctagaggcat aattaggata 480
 ataaatccta taacaatgca gtgtataaag cactatgttg gccatggaaa tgctatcaat 540
 gagctgaaat tccatccaag agatccaaat cttctcctgt cagtaagtaa agatcatgct 600
 ttacgattat ggaatatcca gacggacact ctggtggcaa tatttggagg cgtagaaggg 660
 cacagagatg aagttctaag tgctgattat gatcttttgg gtgaaaaaat aatgtcctgt 720
 ggtatggatc attctcttaa actttggagg atcaattcaa agagaatgat gaatgcaatt 780
 aaggaatctt atgattataa tccaaataaa actaacaggc catttatttc tcagaaaatc 840
 cattttcctg atttttctac cagagacata cataggaatt atgttgattg tgtgcgatgg 900
 ttaggcgatt tgatactttc taagtcttgt gaaaatgcca ttgtgtgctg gaaacctggc 960
 aagatggaag atgatataga taaaattaaa ccagtgat ctaatgtgac tattcttggg 1020
 cgatttgatt acagccagtg tgacatttgg tacatgaggt tttctatgga tttctggcaa 1080
 aagatgcttg cattgggcaa tcaagttggc aaactttatg tttgggattt agaagtagaa 1140
 gatcctcata aagccaaatg tacaacactg actcatcata aatgtggtgc tgctattcga 1200
 caaaccagtt ttagcagggg tagcagcatt cttatagctg tttgtgatga tgccagtatt 1260
 tggcgctggg atcgacttcg ataa 1284

<210> 12
 <211> 427
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens.

<223> Aminosäuresequenz der kurzen Isoform von EED

<400> 12

Met Pro Ala Ala Lys Lys Gln Lys Leu Ser Ser Asp Glu Asn Ser Asn
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Ser Gly Asp Glu Asn Asp Asp Ala Val Ser Ile Glu Ser
 20 25 30

Gly Thr Asn Thr Glu Arg Pro Asp Thr Pro Thr Asn Thr Pro Asn Ala
 35 40 45

Pro Gly Arg Lys Ser Trp Gly Lys Gly Lys Trp Lys Ser Lys Lys Cys
 50 55 60

Lys Tyr Ser Phe Lys Cys Val Asn Ser Leu Lys Glu Asp His Asn Gln
 65 70 75 80

Pro Leu Phe Gly Val Gln Phe Asn Trp His Ser Lys Glu Gly Asp Pro
 85 90 95

Leu Val Phe Ala Thr Val Gly Ser Asn Arg Val Thr Leu Tyr Glu Cys
 100 105 110

His Ser Gln Gly Glu Ile Arg Leu Leu Gln Ser Tyr Val Asp Ala Asp
 115 120 125

Ala Asp Glu Asn Phe Tyr Thr Cys Ala Trp Thr Tyr Asp Ser Asn Thr
 130 135 140

Ser His Pro Leu Leu Ala Val Ala Gly Ser Arg Gly Ile Ile Arg Ile
 145 150 155 160

Ile Asn Pro Ile Thr Met Gln Cys Ile Lys His Tyr Val Gly His Gly
 165 170 175

Asn Ala Ile Asn Glu Leu Lys Phe His Pro Arg Asp Pro Asn Leu Leu
 180 185 190

Leu Ser Val Ser Lys Asp His Ala Leu Arg Leu Trp Asn Ile Gln Thr
 195 200 205

Asp Thr Leu Val Ala Ile Phe Gly Gly Val Glu Gly His Arg Asp Glu
210 215 220

Val Leu Ser Ala Asp Tyr Asp Leu Leu Gly Glu Lys Ile Met Ser Cys
225 230 235 240

Gly Met Asp His Ser Leu Lys Leu Trp Arg Ile Asn Ser Lys Arg Met
245 250 255

Met Asn Ala Ile Lys Glu Ser Tyr Asp Tyr Asn Pro Asn Lys Thr Asn
260 265 270

Arg Pro Phe Ile Ser Gln Lys Ile His Phe Pro Asp Phe Ser Thr Arg
275 280 285

Asp Ile His Arg Asn Tyr Val Asp Cys Val Arg Trp Leu Gly Asp Leu
290 295 300

Ile Leu Ser Lys Ser Cys Glu Asn Ala Ile Val Cys Trp Lys Pro Gly
305 310 315 320

Lys Met Glu Asp Asp Ile Asp Lys Ile Lys Pro Ser Glu Ser Asn Val
325 330 335

Thr Ile Leu Gly Arg Phe Asp Tyr Ser Gln Cys Asp Ile Trp Tyr Met
340 345 350

Arg Phe Ser Met Asp Phe Trp Gln Lys Met Leu Ala Leu Gly Asn Gln
355 360 365

Val Gly Lys Leu Tyr Val Trp Asp Leu Glu Val Glu Asp Pro His Lys
370 375 380

Ala Lys Cys Thr Thr Leu Thr His His Lys Cys Gly Ala Ala Ile Arg
385 390 395 400

Gln Thr Ser Phe Ser Arg Asp Ser Ser Ile Leu Ile Ala Val Cys Asp
405 410 415

Asp Ala Ser Ile Trp Arg Trp Asp Arg Leu Arg
420 425

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
18. März 2004 (18.03.2004)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2004/022772 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **G01N 33/68**,
A61P 3/10, G01N 33/74

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2003/009757

(22) Internationales Anmeldedatum:
2. September 2003 (02.09.2003)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
102 41 111.5 3. September 2002 (03.09.2002) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **ERNST-MORITZ-ARNDT-UNI VERSITÄT
GREIFSWALD** [DE/DE]; Domstr. 14, 17487 Greifswald
(DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WALTHER, Reinhard**
[DE/DE]; Grüner Weg 9A, 17498 Neuenkirchen (DE).

(74) Anwälte: **WEBER-QUITZAU, Martin** usw.; Uexküll &
Stolberg, Beselerstr. 4, 22607 Hamburg (DE).

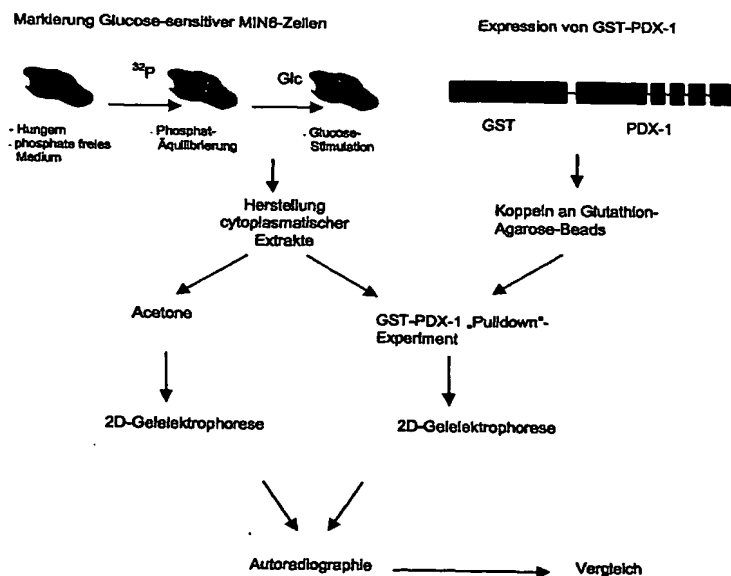
(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR,
CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE,
GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, MZ, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT,
RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR,
TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MODULATION OF THE SYNTHESIS OF INSULIN

(54) Bezeichnung: MODULATION DER INSULINSYNTHESE



(57) Abstract: The invention particularly relates to the use of substances, which modulate the activity of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon and/or of the PcG protein EED or which influence the binding of the proteins casein kinase II (CK II) and 14-3-3 epsilon, of the PcG protein EED and/or of a fragment thereof with the protein pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1) that plays a decisive roll in the glucose-induced biosynthesis of insulin, for influencing the synthesis of insulin or the provision of insulin.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]



TM), europäisches Patent (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

**(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen
Recherchenberichts:**

29. April 2004

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere die Verwendung von Substanzen, die die Aktivität der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon und/oder des PcG-Proteins EED modulieren oder die Bindung der Proteine Caseinkinase II (CK II), 14-3-3 epsilon, des PcG-Proteins EED und/oder eines Fragments desselben mit dem Protein Pancreatic duodenal homeobox-1 (PDX-1), das bei der Glucose-induzierten Insulin-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt, beeinflussen, zur Beeinflussung der Insulin-Synthese bzw. Bereitstellung.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09757

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/68 A61P3/10 G01N33/74

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, MEDLINE

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 01 68108 A (DUFAYET DOMINIQUE ;LEVINE FRED (US); UNIV CALIFORNIA (US)) 20 September 2001 (2001-09-20) abstract	1-3,9-11
A	LOTTMANN H ET AL: "THE TET-ON SYSTEM IN TRANSGENIC MICE: INHIBITION OF THE MOUSE PDX-1 GENE ACTIVITY BY ANTISENSE RNA EXPRESSION IN PANCREATIC BETA-CELLS" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, vol. 79, no. 5/6, June 2001 (2001-06), pages 321-328, XP001176888 ISSN: 0946-2716 cited in the application the whole document	1-3,9-11

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 February 2004

Date of mailing of the international search report

11/03/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gundlach, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with Indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 1 010 433 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 21 June 2000 (2000-06-21) paragraph '0023! claim 9	9-11
X	WO 02 062954 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15 August 2002 (2002-08-15) claims 1,15,16,20	9-11
X	WO 02 062951 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15 August 2002 (2002-08-15) abstract	9-11
X	WO 02 062818 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15 August 2002 (2002-08-15) abstract	9-11
P,X	WALTHER R ET AL: "GLUCOSE-INDUCED PHOSPHORYLATION OF PDX-1 BY CASEINE KINASE 2 (CK2)" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, vol. 46, no. SUPPL 2, 24 August 2003 (2003-08-24), page A175 XP001184138 ISSN: 0012-186X abstract	1-3,9-11
A	MACFARLANE W M ET AL: "THE P38/REACTIVATING KINASE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADE MEDIATES THE ACTIVATION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR INSULIN UPSTREAM FACTOR 1 AND INSULIN GENE TRANSCRIPTION BY HIGH GLUCOSE IN PANCREATIC BETA-CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 272, no. 33, 15 August 1997 (1997-08-15), pages 20936-20944, XP001176890 ISSN: 0021-9258 abstract -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: IPF1_HUMAN, 1 October 1996 (1996-10-01) "PDX-1" Database accession no. P52945 XP002271314 abstract	1-3,9-11

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>LOZEMAN F J ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN CDNA CLONES ENCODING THE ALPHA AND THE ALPHA' SUBUNITS OF CASEIN KINASE II" BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, vol. 29, no. 36, 1990, pages 8436-8447, XP001184136 ISSN: 0006-2960 cited in the application abstract -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: KC21_HUMAN, 1 November 1990 (1990-11-01) "Casein kinase II, alpha chain" Database accession no. P19138 XP002271315 abstract -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: KC22_HUMAN, 1 February 1991 (1991-02-01) "Casein kinase II, alpha' chain" Database accession no. P19784 XP002271316 abstract</p>	1-3,9-11
A	<p>-----</p> <p>EHRINGER M A ET AL: "HIGH-THROUGHPUT SEQUENCE IDENTIFICATION OF GENE CODING VARIANTS WITHIN ALCOHOL-RELATED QTLS" MAMMALIAN GENOME, NEW YORK, NY, US, vol. 12, no. 8, 2001, pages 657-663, XP001165658 ISSN: 0938-8990 abstract -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: 143E_HUMAN, 1 November 1995 (1995-11-01) Database accession no. P42655 XP002271318 abstract</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-3,9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 03/09757

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>RIETZLER M ET AL: "The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 16 OCT 1998, vol. 273, no. 42, 16 October 1998 (1998-10-16), pages 27459-27466, XP001188256 ISSN: 0021-9258 abstract -& DATABASE EMBL 'Online! 1 May 2000 (2000-05-01) "WAIT-1" Database accession no. Q9UNY7 XP002271319 abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-3,9-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP03/09757

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

4-8
2. ☒ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

see supplemental sheet FURTHER INFORMATION PCT/ISA/210
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box I, 2

Claims 4-8

The current claims 4-8 concern compounds or products, methods and uses which relate to these compounds, characterized in each case by a desirable property or characteristic, namely that they can be discovered by the screening process as per claim 1.

Therefore the claims encompass all products, etc. which exhibit this property or characteristic, but the application provides support by the description (PCT Article 5) for none of these products. In the present case, the claims lack the proper support and the application lacks the requisite disclosure to such an extent that it appears impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought.

Moreover, the claims also lack the requisite clarity (PCT Article 6) since they attempt to define the product, method, compound or device by the desired result. This lack of clarity too is such that it is impossible to carry out a meaningful search covering the entire range of protection sought. Therefore the search was directed to the parts of the claims that appear to be clear, supported or disclosed in the above sense, that is the parts concerning the screening processes as per claims 1-3 *per se*.

The applicant is advised that claims or parts of claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally need not be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 03/09757

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0168108	A	20-09-2001	US 6448045 B1	10-09-2002
			AU 4557001 A	24-09-2001
			CA 2402265 A1	20-09-2001
			EP 1263449 A1	11-12-2002
			WO 0168108 A1	20-09-2001
			US 2002151065 A1	17-10-2002
EP 1010433	A	21-06-2000	EP 1010433 A1	21-06-2000
			US 6498139 B1	24-12-2002
			WO 9916462 A1	08-04-1999
			US 2002132759 A1	19-09-2002
WO 02062954	A	15-08-2002	US 6440738 B1	27-08-2002
			WO 02062954 A2	15-08-2002
WO 02062951	A	15-08-2002	US 6455307 B1	24-09-2002
			WO 02062951 A2	15-08-2002
WO 02062818	A	15-08-2002	US 2002147163 A1	10-10-2002
			WO 02062818 A2	15-08-2002

INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09757

A. KLASSTIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 G01N33/68 A61P3/10 G01N33/74

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, MEDLINE

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	WO 01 68108 A (DUFAYET DOMINIQUE ; LEVINE FRED (US); UNIV CALIFORNIA (US)) 20. September 2001 (2001-09-20) Zusammenfassung	1-3,9-11
A	LOTTMANN H ET AL: "THE TET-ON SYSTEM IN TRANSGENIC MICE: INHIBITION OF THE MOUSE PDX-1 GENE ACTIVITY BY ANTISENSE RNA EXPRESSION IN PANCREATIC BETA-CELLS" JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE, SPRINGER VERLAG, DE, Bd. 79, Nr. 5/6, Juni 2001 (2001-06), Seiten 321-328, XP001176888 ISSN: 0946-2716 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-3,9-11



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

24. Februar 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

11/03/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gundlach, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	EP 1 010 433 A (DAIICHI SEIYAKU CO) 21. Juni 2000 (2000-06-21) Absatz '0023! Anspruch 9 ---	9-11
X	WO 02 062954 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15. August 2002 (2002-08-15) Ansprüche 1,15,16,20 ---	9-11
X	WO 02 062951 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15. August 2002 (2002-08-15) Zusammenfassung ---	9-11
X	WO 02 062818 A (FREIER SUSAN M ;MCKAY ROBERT (US); ISIS PHARMACEUTICALS INC (US);) 15. August 2002 (2002-08-15) Zusammenfassung ---	9-11
P,X	WALTHER R ET AL: "GLUCOSE-INDUCED PHOSPHORYLATION OF PDX-1 BY CASEINE KINASE 2 (CK2)" DIABETOLOGIA, BERLIN, DE, Bd. 46, Nr. SUPPL 2, 24. August 2003 (2003-08-24), Seite A175 XP001184138 ISSN: 0012-186X Zusammenfassung ---	1-3,9-11
A	MACFARLANE W M ET AL: "THE P38/REACTIVATING KINASE MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE CASCADE MEDIATES THE ACTIVATION OF THE TRANSCRIPTION FACTOR INSULIN UPSTREAM FACTOR 1 AND INSULIN GENE TRANSCRIPTION BY HIGH GLUCOSE IN PANCREATIC BETA-CELLS" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 272, Nr. 33, 15. August 1997 (1997-08-15), Seiten 20936-20944, XP001176890 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung -& DATABASE SWISS-PROT 'Online! ID: IPF1_HUMAN, 1. Oktober 1996 (1996-10-01) "PDX-1" Database accession no. P52945 XP002271314 Zusammenfassung --- -/--	1-3,9-11

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>LOZEMAN F J ET AL: "ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF HUMAN CDNA CLONES ENCODING THE ALPHA AND THE ALPHA' SUBUNITS OF CASEIN KINASE II"</p> <p>BIOCHEMISTRY, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY. EASTON, PA, US, Bd. 29, Nr. 36, 1990, Seiten 8436-8447, XP001184136</p> <p>ISSN: 0006-2960</p> <p>in der Anmeldung erwähnt</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>-& DATABASE SWISS-PROT 'Online!</p> <p>ID: KC21_HUMAN,</p> <p>1. November 1990 (1990-11-01)</p> <p>"Casein kinase II, alpha chain"</p> <p>Database accession no. P19138</p> <p>XP002271315</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>-& DATABASE SWISS-PROT 'Online!</p> <p>ID: KC22_HUMAN,</p> <p>1. Februar 1991 (1991-02-01)</p> <p>"Casein kinase II, alpha' chain"</p> <p>Database accession no. P19784</p> <p>XP002271316</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>---</p>	1-3,9-11
A	<p>EHRINGER M A ET AL: "HIGH-THROUGHPUT SEQUENCE IDENTIFICATION OF GENE CODING VARIANTS WITHIN ALCOHOL-RELATED QTLS" MAMMALIAN GENOME, NEW YORK, NY, US, Bd. 12, Nr. 8, 2001, Seiten 657-663, XP001165658</p> <p>ISSN: 0938-8990</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>-& DATABASE SWISS-PROT 'Online!</p> <p>ID: 143E_HUMAN,</p> <p>1. November 1995 (1995-11-01)</p> <p>Database accession no. P42655</p> <p>XP002271318</p> <p>Zusammenfassung</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1-3,9-11

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>RIETZLER M ET AL: "The human WD repeat protein WAIT-1 specifically interacts with the cytoplasmic tails of beta7-integrins." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. UNITED STATES 16 OCT 1998, Bd. 273, Nr. 42, 16. Oktober 1998 (1998-10-16), Seiten 27459-27466, XP001188256 ISSN: 0021-9258 Zusammenfassung -& DATABASE EMBL 'Online! 1. Mai 2000 (2000-05-01) "WAIT-1" Database accession no. Q9UNY7 XP002271319 Zusammenfassung _____</p>	1-3,9-11

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 03/09757

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
2. ☒ Ansprüche Nr. 4-8
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
siehe Zusatzblatt WEITERE ANGABEN PCT/ISA/210
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld I.2

Ansprüche Nr.: 4-8

Die geltenden Patentansprüche 4-8 beziehen sich auf Verbindungen, bzw. Produkte, Verfahren und Verwendungen, die sich auf diese Verbindungen beziehen, jeweils charakterisiert durch eine erstrebenswerte Eigenheit oder Eigenschaft, nämlich, dass sie durch das Screening Verfahren gemäss Anspruch 1 auffindbar sind.

Die Patentansprüche umfassen daher alle Produkte etc., die diese Eigenheit oder Eigenschaft aufweisen, wohingegen die Patentanmeldung Stütze durch die Beschreibung im Sinne von Art. 5 PCT für keine solchen Produkte liefert. Im vorliegenden Fall fehlen den Patentansprüchen die entsprechende Stütze bzw. der Patentanmeldung die nötige Offenbarung in einem solchen Maße, daß eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich erscheint. Desungeachtet fehlt den Patentansprüchen auch die in Art. 6 PCT geforderte Klarheit, nachdem in ihnen versucht wird, das Produkt/Verfahren/die Verbindung/Vorrichtung über das jeweils erstrebte Ergebnis zu definieren. Auch dieser Mangel an Klarheit ist dergestalt, daß er eine sinnvolle Recherche über den gesamten erstrebten Schutzbereich unmöglich macht. Daher wurde die Recherche auf die Teile der Patentansprüche gerichtet, welche im o.a. Sinne als klar, gestützt oder offenbart erscheinen, nämlich die Teile betreffend die Screeningverfahren gemäss der Ansprüche 1-3 per se.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß Patentansprüche, oder Teile von Patentansprüchen, auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, daß die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, daß der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäß Kapitel II PCT neue Patentansprüche vorlegt.

INTERNATIONALER RESEARCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 03/09757

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 0168108	A	20-09-2001	US	6448045 B1	10-09-2002
			AU	4557001 A	24-09-2001
			CA	2402265 A1	20-09-2001
			EP	1263449 A1	11-12-2002
			WO	0168108 A1	20-09-2001
			US	2002151065 A1	17-10-2002
EP 1010433	A	21-06-2000	EP	1010433 A1	21-06-2000
			US	6498139 B1	24-12-2002
			WO	9916462 A1	08-04-1999
			US	2002132759 A1	19-09-2002
WO 02062954	A	15-08-2002	US	6440738 B1	27-08-2002
			WO	02062954 A2	15-08-2002
WO 02062951	A	15-08-2002	US	6455307 B1	24-09-2002
			WO	02062951 A2	15-08-2002
WO 02062818	A	15-08-2002	US	2002147163 A1	10-10-2002
			WO	02062818 A2	15-08-2002

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.